

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-11861

⑪ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和63年(1988)1月19日

G 01 N 33/543

Z-7906-2G

A 61 B 10/00

C-7437-4C

C 12 Q 1/00

B-8412-4B ※審査請求 未請求 発明の数 4 (全13頁)

⑭ 発明の名称 結合反応を電子的に測定する方法

⑮ 特 願 昭62-71319

⑯ 出 願 昭62(1987)3月25日

優先権主張 ⑰ 1986年3月25日 ⑱ 米国(US) ⑲ 843982

⑳ 発 明 者 スーザン ジェイ ム アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 53132 フランクリン
 ロツコースキー
 ㉑ 出 願 人 スーザン ジェイ ム アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 53132 フランクリン
 ロツコースキー
 ㉒ 出 願 人 ケニス エイ シーゲ アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 53005 ブルックフ
 スムンド
 ㉓ 出 願 人 ドナルド イー ヨー アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 53220 グリーンフ
 ド
 ㉔ 代 理 人 弁理士 中 村 稔 外5名
 最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

結合反応を電子的に測定する方法

2. 特許請求の範囲

(1) 互いに接触した際に結合するような一対の物質間の結合反応を検出する方法であって、上記の結合反応を生じさせる状態のもとで上記物質を互いに結合させそして結合反応の進行を指示する手段を用意するという段階を具備する方法において、更に

不完全な電気回路を画成する手段の存在中で上記一対の物質の混合物を形成して、上記の結合反応によって上記電気回路を完成させ、そして

上記結合反応の発生を指示する上記回路の電気特性の変化を測定する段階を具備したことを特徴とする方法。

(2) 錯体を形成するように互いに結合する一対の第1及び第2の物質間の結合反応を検出する方法において、

上記第1の物質が表面に結合された導電性の粒子を、非導電性基板上に配設した一対の離間した導体間に画成されたチャンネルの底面に結合した上記第2物質の層と接触させるように配置し、上記第1物質と第2物質との結合反応により上記粒子を上記底面に結合させて凝集体を形成し、

電気回路を完成するように上記チャンネルを横切る上記凝集体の橋絡により生じる電気的特性の変化を測定し、この電気的な変化が上記第1物質と第2物質との間の結合反応を指示することを特徴とする方法。

(3) 上記導電性粒子は、本質的に、銀及び金より成るグループから選択された少なくとも1つの金属で構成される特許請求の範囲第2項に記載の方法。

(4) 上記粒子の平均直径は、0.01ないし1.0ミクロンの範囲である特許請求の範囲第3項に記載の方法。

(5) 上記一対の物質は、抗体と、微生物又はその一部分、薬品、ホルモン、アレルギー、腫瘍

マーカ、ファクタ、酵素、ステロイド及びスクレオチドより成るグループから選択された1つの部材とを備えている特許請求の範囲第2項に記載の方法。

(6) 電気的変化を測定する上記の段階は、更に、上記電気回路の電気抵抗の変化を測定することを含む特許請求の範囲第2項に記載の方法。

(7) 上記第1の物質は上記抗体を備え、更に、上記抗体を含むサンプルをコロイド状の金と混合して、上記第1物質が表面に結合された上記導電性粒子を作成する段階を具備した特許請求の範囲第5項に記載の方法。

(8) 上記チャンネルの巾は、0.1ないし100ミクロンの範囲である特許請求の範囲第2項に記載の方法。

(9) オームメータを上記導体に作動的に接続して上記電気回路を形成する段階を更に具備した特許請求の範囲第6項に記載の方法。

(10) テストサンプル中の抗原を検出する方法において、

た上記抗原の第2の層とを用いて前記の段階i)ないしiv)を繰返し、そして

vi) 上記テストサンプル及び上記制御サンプルに関連した電気的特性の変化を比較して、上記テストサンプル中に存在する上記抗原の量を測定するという段階を具備する方法。

(12) 前記の段階ii)は、更に、

A) 上記抗原の層をフラッシュして、結合しなかった粒子を除去し、そして

B) 上記抗原の層を乾燥させるという段階を含んでいる特許請求の範囲第10項に記載の方法。

(13) 上記導体は、一対の横に離間された導電性の層である特許請求の範囲第12項に記載の方法。

(14) 上記段階i)において、抗体が表面に結合された上記導電性粒子をキャリア液体に懸濁させる特許請求の範囲第12項に記載の方法。

(15) 上記段階i)は、更に、上記サンプルを、上記抗体が表面に結合されたコロイド状の導電性金属粒子の標本と混合させる段階を含む特許

i) 抗体が表面に結合された所定量の導電性粒子を上記テストサンプルに導入し、上記テストサンプル中の抗原を上記粒子の表面上の抗体の一部分に効果的に結合させ、

ii) 非導電性の表面に結合された上記抗原の層に上記粒子を付着し、上記抗原の層は、上記非導電性表面上の一対の導体間に介在するものであり、

iii) 上記導体間の上記層に結合された上記粒子の凝集体を形成し、そして

iv) 上記凝集体で上記導体間を橋絡することによって生じた電気的特性の変化を測定し、この電気的特性の変化が上記テストサンプル内の上記抗原を指示するようにしたことを特徴とする方法。

(11) 特許請求の範囲第10項に記載の方法において、更に、

v) 上記テストサンプルに代わって上記抗原を含まない制御用サンプルと、上記抗体が表面に結合された第2の所定量の上記導電性粒子と、第2対の各導体間で第2の非導電性表面に結合され

請求の範囲第14項に記載の方法。

(16) 一対の物質間の化学的な結合反応を検出するのに用いる診断素子において、

非導電性の基板と、

上記基板上に配置された一対の離間された電気導体と、

上記導体間で上記基板上に配置された一方の上記物質の層とを具備することを特徴とする診断素子。

(17) 上記導体は、上記基板上に横に並んで配置された一対の離間された導電性の層より成り、これらの層は、その間にチャンネルを画成し、一方の上記物質の層は、上記チャンネルの底面に結合される特許請求の範囲第16項に記載の診断素子。

(18) 上記導電性の層は、本質的に、導電性の金属で構成され、上記導電性の層の厚みは、0.5ミクロン以下である特許請求の範囲第17項に記載の診断素子。

(19) 上記チャンネルの巾は、0.1ないし

100ミクロンである特許請求の範囲第18項に記載の診断素子。

(20) 上記一対の物質は、抗体と、微生物又はその一部分、薬品、ホルモン、アレルギー、腫瘍マーカー、ファクタ、酵素、ステロイド及びヌクレオチドより成るグループから選択された1つの部材とを備えている特許請求の範囲第17項に記載の診断素子。

(21) 上記素子は、更に、

上記基板上の離間された位置に配置された複数の上記対の電気導体と、

別の物質との結合反応を受ける種々の物質の複数の層であって、それに関連した対の導体間で上記基板上に配置されているような層と、

上記基板の縁付近に配置された複数の導電性端子と、

上記導体の対の各々からそれに対応する対の上記端子へ電流を導通する電気接続手段とを具備し、上記端子の一方は、それに関連した導体対の一方の導体に電気的に接続され、上記端子の他方

は、上記導体対の他方の導体に電気的に接続される特許請求の範囲第16項に記載の診断素子。

(22) 上記基板は、実質的に長方形であり、上記端子は、上記基板の2つの隣接縁に沿って一対の行として配置され、上記導体対の各々は、別々の対の端子に組み合わされていて、1つの対の2つの導体が上記電気接続手段によって他の対の導体と同じ2つの端子に接続されないようにした特許請求の範囲第21項に記載の診断素子。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、一対の化学的な物質、特に、抗原や抗体のような生物活動に必要な物質間で行なわれる結合反応を電子的に検出する新規な方法に関する。更に、本発明は、電子的な免疫分析のための新規な方法に関する。

従来の技術

生物は、バクテリアやビールスのような外から浸入してくる異物質や微生物に対してその身体を保護するために抗体と称する微細な物質を形成することが免疫学的な原理として良く知られている。抗体は、典型的に、微細な侵入物質に結合してこれを破壊するか又は無害なものとすることによりこれら物質を中性化するように働く。抗体は、結晶のグロブリン蛋白質であり、ガンマグロブリンとしばしば称される。

バクテリアやビールスのような異物質が外部から人間や動物に浸入すると、感染と戦うための抗体の形成が1つ以上の抗原の存在によって促進

される。浸入する微生物に関連した抗原は、そこから得られる異物質、例えば、バクテリアやビールスの一部分で構成される。より一般的には、抗原は、免疫反応を開始させることのできる物質である。人体内の幾つかの特殊な細胞は、抗原を含んでおり、その抗原に対して特に構成された抗体を形成する。このような抗体は、人体内に放されると、その抗原を識別してこれと結合し、感染と戦う。抗体は、非常に特殊なもので、一般には、その形成を促進する抗原としか結合しない。

或る人が或る疾病に感染すると、その人の血液は、その疾病に特有の測定可能なレベルの抗原を含むことがしばしばある。このような感染が存在するかどうかを判断するために、患者の血液サンプルを用いて免疫診断テストが行なわれる。このサンプルは、或る疾病又は症状に特有の抗体を含むと分かっている溶液と混合される。抗原-抗体反応が生じた場合には、テスト結果が肯定であり、抗原が検出される。このようなテストは典型的に可逆であり、即ち、或る抗原を含むと分かっ

ている溶液又は試薬を用いてそれに対応する抗体がサンプル中に存在するかどうかを判断することができる。しかしながら、抗原-抗体反応は微細なレベルで生じるだけで、容易に観察することができない。従って、公知の全ての免疫診断テストは、抗原-抗体反応が生じたことを指示するための或る種の手段をもたらずに過ぎない。

発明が解決しようとする問題点

抗原-抗体反応を検出するために色々な技術が利用されている。現在利用されている主たる技術は、酵素免疫分析、免疫蛍光性分析及び放射線免疫分析である。典型的な酵素免疫分析の手順においては、酵素によって無色の物質から着色した生成物を形成することにより抗原-抗体反応が検出される。免疫蛍光性技術では、一般的に顕微鏡で観察しなければならないような少量の光が放射されることによって反応が生じたことが指示される。放射線免疫分析では、放射性標識物質を使用し、少量の放射能の有無によって抗原-抗体反応の発生が測定される。これらの公知の方法は信賴

性の高いものではあるが、時間がかかる上に非常にやっかいである。

最近では、種々の形式の電気的な免疫分析技術が開発されている。このような方法では、免疫反応を測定するために電子的なエンドポイントが使用される。ここで使用する「電子的なエンドポイント」という用語は、結合反応が生じたことを指示する電気的特性の変化、例えば、抗原-抗体反応による電流、電圧又は抵抗の変化を意味している。

このような1つの技術は、電界効果トランジスタのゲート領域に抗体の層を被覆したものをを用いている。抗原-抗体反応が生じた場合には、トランジスタの電荷密度が変化する。この形式のシステムが、例えば、1980年12月9日付けのシェンク(Schenck)氏の米国特許第4,238,757号、1981年12月25日付けのグッケル(Guckel)氏の米国特許第4,180,771号及び1982年6月15日付けのマルモロス(Malamos)氏の米国特許第4,334,880号に開

示されている。

免疫学的な反応を電気的に測定するための多数の他の方法が提案されている。1つの免疫試薬に電気的に活性な物質で標識を付けることにより電気測定式の免疫分析を行なうことができる。1980年11月11日付けのペース(Pace)氏の米国特許第4,233,144号には、1つのこのような技術が開示されている。その別の方法としては、2つの導電層の間に抗原-抗体層をサンドイッチしそしてそれにより生じる積層体の電気的なキャパシタンスを測定することが含まれる。1977年10月18日付けのギアエバー(Giaever)氏の米国特許第4,054,646号には、このような方法が開示されている。更に別の方法においては、変化の作用を表わす信号の検出と、酵素免疫分析技術とが組み合わされる。このような方法は、1981年9月1日付けのギボン(Gibbon)氏の米国特許第4,287,300号に開示されている。然し乍ら、以上の電気的な方法は、医療に携わる者や研究室にいる者に対して、免疫診断

テストを実行するための簡単で、迅速で、感度が高く、安価で且つ使い易い手段をもたらずものではない。

本発明の1つの特徴は、抗原又は抗体で標識付けされたコロイド状の金の粒子を使用するものである。一般に、「コロイド状の金」とは、微細な金の粒子が水もしくは水溶液中に懸濁したものを指し、これらの金の粒子の外面には特定の抗体が結合されている。このような粒子の形成については、1984年5月1日付けのデメイ(DeMay)氏等の米国特許第4,446,238号及び1983年12月13日付けのデメイ氏等の米国特許第4,420,558号に開示されている。これらデメイ氏等の全内容を参考としてここに取り上げる。このようなコロイド状の金の粒子は、これまでも免疫診断テストに使用されており、抗原-抗体反応の結果として反射される少量の光を観察することによりその結果を光学的に判断することができる。上記のデメイ氏等の特許には、前記形式の高輝度フィールド光線方法が開示されてい

る。本発明は、電子的なエンドポイントを用いた新規な免疫診断方法にコロイド状の金を効果的に利用するものである。

問題点を解決するための手段

本発明は、一対の第1及び第2の物質、特に、生物活動に必要な物質間で行なわれる結合反応であって、化学的な錯体を形成するよう互いに結合する反応を検出するための効果的な方法を提供する。本発明の方法は、これらの物体を互いに近づけてそれらの間での結合反応により開放電気回路を開成（閉じ）させることを含む。これにより生じる回路の電気状態の変化が結合反応を指示する。

本発明の更に別の特徴によれば、結合反応の検出に用いられる診断素子は、一対の離間された電気導体、特に、非導電性の基板上に横に並んで配置された導電性の層を具備している。これら導体間のスペースで狭いチャンネルを画成することができる。互いに結合する一対の物質の一方は、導体間に位置する非導電性基板の表面、例えば、チャンネルの底面に付着され、固定される。電気

回路を形成する手段は、チャンネルが回路の切断点を構成するように各々の導電層に接続することができる。ここで使用する「診断素子」という用語は、基板、導体及び1つの結合物質の層を指すものであって、電気回路を形成する手段は含まない。このような診断素子及び電気回路形成手段は、一対の物質間の結合反応によって回路の切断点を橋絡する適当な手段と関連して容易に使用することができる。このような手段の1つは、以下で詳細に述べるように一方の物質を導電性粒子の表面に接合することを含む。

本発明の別の特徴によれば、錯体形成物質間の反応を検出する前記の方法は、抗原-抗体反応の検出に特に用いられる。凝集物の形成程度及びそれにより生じる電荷の程度を使用して、以下で詳細に述べるように、患者からのサンプルが所与の抗体又は抗原を含むかどうかを判断することができる。

実施例

以下、添付図面を参照し、本発明の好ましい

実施例を詳細に説明する。

本発明の方法は、生物身体内の抗原を検出するのに特に有用である。このような抗原は、薬品、毒素、ホルモン、アレルゲン、腫瘍マーカ、ファクタ、酵素、ステロイド、スクレオチド及び参考としてここに取り上げる1982年4月27日付けのハング(Huang)氏の米国特許第4,327,073号にリストされた他の物質を含む。前記の物質は、抗原と反応してこれに結合する反応物質(抗体)の生成を促進する。従って、本発明の方法は、人間や下等動物の身体内に存在する種々様々な物質を検出するのに有用である。

特に、本発明の方法は、患者がどの薬品を飲んだかを素早く判断することが所望される薬過量処理に特に有用である。又、本発明の方法は、特定の疾病又は症状に関連した患者の血液流内の抗原の存在を検出するのに非常に有用である。

第1A図ないし第1E図は、本発明によって抗原を検出する方法を概略的に説明するものである。第1A図ないし第1C図を参照すれば、特定

の抗原12Aを含む全血、血清又は尿といった患者からのサンプル11A(第1A図)は、抗体15Aが外面に付着された金の粒子14Aを所定量含んでいるコロイダル状の金の標本13A(第1B図)と混合される。抗体15Aは、特に、抗原12Aに結合される(第1C図)。それにより得られる混合物16Aにおいては、抗原12Aが抗体15Aに結合し、抗原12A及び抗体15Aが粒子14Aに結合したものより成る遊離錯体18Aが形成される。抗体15Aの方が抗原12Aよりも多いので、幾つかの抗体15Aは遊離したまゝとなり、即ち、抗原12Aに結合しない。

第2A図ないし第2C図に示されたように、抗原12Aを含まない制御用のサンプル11B(第2A図)と、患者サンプル11Aに用いた標本13Aと組成が実質的に同じである第2のコロイダル状の金の標本13B(第2B図)とを用いて上記の手順を実行した。このようにして形成された第2の混合物16B(第2C図)は、第1C図に示す錯体18Aを含んでおらず、従って、抗

原が表面に結合されない粒子14Bを非常に多数有している。患者サンプルに対応する第1の混合物16A(第1C図)及び制御用に対応する第2の混合物16B(第2C図)は、本発明による反応検出器20(第1D図及び第2D図)に使用する用意ができる。

第3図を説明すれば、反応検出器20は、非導電性の基板22と、この基板22上に横に並んで配置された一対の薄い離間された導電性の層23、24(それらの間にチャンネル32が形成されている)と、電気回路を形成する手段、例えば、図示されたようにワイヤ28によって層23、24に機能的に接続されたオームメータ26とを備えている。基板22は、典型的に、ポリスチレン、ガラス又は結晶シリコンのような非導電性材料で形成される。層23、24は、導電性材料、特に、導電性の金属、例えば、金、銀、銅、クロム又はアルミニウムで形成される。

再び、第1図及び第2図を説明すれば、同一の第1及び第2の反応検出器20A(第1D図)

を介して底面33Aに効果的に結合される。抗原-抗体反応を行なうのに用いる反応条件は良く知られている。サンプル11Aからの抗原12Aを含む錯体18Aは、底面33Aに結合する傾向がない。抗原-抗体反応を行なうことのできる適当な時間の後に、チャンネル32Aは、もし所望ならば、適当な液体、例えば、水や塩溶液でフラッシュされ、結合しなかった粒子14Aが洗浄され、反応検出器を加熱するか又は空気に対して開放させるような適当な手段によって乾燥される。

第4A図及び第4B図を説明すれば、第4A図は、第1E図と同じ状態に対応しそして第4B図は、第2E図と同じ状態に対応する。第4A図及び第4B図は、第1E図及び第2E図では明らかでない結合反応の程度の差を示している。オームメータ26A及び26Bは、検出器20A及び20Bの各々に対するチャンネル32A及び32B間の抵抗値を登録する。制御については(第4B図)、遊離した抗体15Bが付着した全ての粒子14Bを用いて、底面33Bに結合した抗原層

及び20B(第2D図)が、各々、混合物16A及び16Bと共に使用するために前以て形成される。キャリア液体(例えば、水や塩水溶液)内の抗原のサンプルは、層23A、23Bと24A、24Bとの間に形成された浅いチャンネル即ちグループ32A、32Bに注入され、これらチャンネルの底面33A、33Bの表面に抗原を結合させて、抗原層30A、30Bを形成させる(第1D図及び第2D図)。これらの抗原層30A、30Bは、検出されるべき抗原12Aと同じ形式の抗原で形成される。

第1E図を説明すれば、患者のサンプル11A(第1A図)に対応する第1の混合物16A(第1C図)は、第1の検出器20Aのチャンネル32Aに注入され、抗原層30Aと抗体15Aとが結合される。制御用の混合物16B(錯体18Aのない)及び第2の検出器20B(第2E図)を用いて前記の手順を実行した。

遊離した抗体15Aを有する導電性の粒子14Aは、抗原-抗体結合反応により抗原層30A

30Bと結合することができる。その結果、底面33Bに錯体35Bが形成され、固定される。第4B図に示すように、錯体35Bは、互いに接触して1かたまりとなる傾向があり、チャンネル32Bを効果的に橋結する凝集体即ちチェーン39Bを形成する。粒子14Bは導電性であるから、凝集体39Bは、層23Bと24Bとの間に電気的な接続を効果的に与え、オームメータ26B、ワイヤ28B、層23B、24B及び凝集体39Bによって画成された電気回路を完成する。これは、オームメータ26Bにより与えられる抵抗値の読みによって表わされる。凝集体39Bの橋結により抵抗値が急激に減少する。

患者サンプルに対応する混合物16Aのための反応は同様に行なわれるが、この混合物16Aは、抗原12Aと抗体15Aとの反応により形成された錯体18Aを既に含んでいる。これら錯体18Aの抗体は、少なくとも若干の抗原12Aと既に結合されているので、これらの錯体18Aは、底面33Aにある抗原30Aの層に結合しない。

混合物16Aにおいては、粒子14Aに付着した遊離した抗体15Aの数が混合物16Bの場合より少ない。というのは、これら抗体15Aの幾つかが錯体18Aの形成に使用されたからである。第4A図に示されたように、凝集体39Aは形成されるが、このような凝集体は少数であり、従って、チャンネル32Aの橋絡の程度も僅かである。その結果、オームメータ26Aに登録された抵抗値の低下は、オームメータ26Bに登録された抵抗値の低下よりも小さくなる。この読みの差は、患者からのサンプル11Aにおける抗原12Aの存在を示している。患者からのサンプル11Aが抗原12Aを含んでいない場合には、反応検出器20Aについての抵抗値の低下が検出器20Bについての抵抗値の低下と同じになる。

サンプルの特定の抗原レベルに対応する抵抗値が特定のテストに対して分かっている場合には、第2A図ないし第2E図及び第4B図に示した制御を行わずに上記の手順を実行することができる。然し乍ら、制御によって形成される対応する

に実質的に結合されない。

上記の手順に使用した反応検出器20は、次のように設計される。チャンネル32の巾は、特に、チャンネル32を橋絡するチェーンを形成する導電性粒子の単純な数値的な平均直径に対し変化する。次の表は、本発明による寸法の好ましい範囲を示している。

平均導電 粒子直径 (μ)	チャン ネル巾 (μ)	チャンネル 巾対粒子直 径の比率
0.01-500	0.1-20,000	5:1-40:1
0.01-10	0.1-100	10:1-30:1
0.01-1	1-25	15:1-25:1

チャンネル巾対平均粒子直径の比は、20:1であるのが典型的であり、例えば、チャンネルの巾が10 μ でありそして導電性粒子の平均直径が0.5 μ である。

良く知られているように、抗原は、ポリスチレンに対して親和力を有し、或る条件のもとでこれに結合される。これに対し、抗体は、以下に述

べ抵抗値の読みにより正確な結果が得られるので、制御を用いることが好ましい。

第1図ないし第4図に示す手順は、説明のためかなり簡単化されている。導電性の粒子14A、14Bは、抗原12A及び抗体15A、15Bより大きなものである。多数の抗体15A、15Bが1つの導電性粒子14A又は14Bに結合し、同様に、多数の抗原12Aが1つの粒子14A又は14Bの表面上の抗体15Aと結合することができる。第5図は、抗体15Bが表面に付着した導電性粒子14Bが抗原層30Bを経て底面33Bにいかにかに結合されるかを概略的に示している。

上記した錯体18Aは、実際には、その表面に付着した幾つかの遊離した抗体15Aと、抗原12Aに結合した幾つかの抗体15Aとを有する粒子14Aを備えている。然し乍ら、これらの錯体18Aにおいては、遊離した抗体（混合物16Aの抗原12Aに結合しない）比率が十分に低くて、錯体18Aはチャンネル32Aの底面33A

べる手順を用いて金の粒子のような微細な金属粒子の表面に容易に結合する。従って、抗原-抗体の結合を伴う本発明の実施例では、抗原をチャンネルの底面に結合しそして抗体を導電性粒子に結合するのが好ましい。然し乍ら、逆の構成（抗原-粒子、抗体-チャンネル）も使用可能である。

層23、24は、機能的であると分かっている寸法であればいかなる所望の寸法でもよい。これらの層23、24は、できるだけ薄いのが好ましく、その厚みは約0.5 μ 以下であり、特に、0.001-0.005 μ の範囲であるのが好ましい。従来のスパッタ付着を容易に使用して層23、24を形成することができる。層23、24は、非導電性の基板上に丸い「ドット」を定めるように長方形（第2図）又は半円形のような所望の形状をもつことができる。一般に、基板22は、プラスチック、好ましくは、メチルセルローズ、ナイロン又はポリスチレンで形成される。基板22は、顕微鏡スライドを形成するのに使用される形式のポリスチレンで形成されるのが最も好ましい。

というのは、抗原分子の極性によりこれら分子を基板に結合させて実質的に完全な均質な抗原被膜を形成させるからである。

ガラスそれ自体は、基板22として一般的に使用されない。というのは、抗原は、ガラス面に対して親和力が弱く、抗原の層をガラススライドに付着することが困難であると分かっているからである。然し乍ら、本発明の更に別の特徴によれば、ガラススライドを表面処理して、ガラススライド上の被膜に対する抗原の親和力を、ポリスチレンスライドに対する抗原の親和力とほぼ同程度にすることができると分かっている。この表面処理は、ガラススライドにチタニウム・オキシニトライド (TiO_xNy) の薄い層を被覆することを含む。この技術の一例を以下に示す。

第8図は、多数の層23、24が1枚の非導電性基板22の上に配置された本発明の診断素子の更に別の実施例を示している。この実施例のための導電性手段28は、一連の個々の電気導体61を備えており、これら電気導体の各々は共通の

対の抵抗値を測定するために端子プレート63の種々の組合体に接続することができる。このような測定を行なうために、オームメータ26は、基板22の別々の縁上で2つのプレート63に接続される。第8図の実施例では、オームメータをプレート63C、63Dに接続し、層23C、24Dの指示された対のテストを行なう。

上記の実施例では、各対の層23、24間に別々の物質を結合することもできるし、上記したように制御機能を果たすためにそれらの間に物質を結合しなくてもよいので、本発明による1つの診断素子で、抗原のような多数の種々の物質に対し、1つの患者サンプルをテストすることができる。

例

以下の手順を使用し、本発明により抗体で標識付けした金粒子の懸濁物を形成した。塩化金の1% w/v (重量/体積) 水溶液を約1 ml 使用し、これを、約0.1 ml のKodak D-19写真現像液と混合し、塩化金を還元して金粒子を生成した。

導体62に接続され、そしてこの導体は、基板22の縁に取り付けられた端子プレート63に接続される。層23、24の対は、基板22上で行列に配置される。

第8図の実施例では、プレート63の行が長方形の基板22の隣接する側縁に配置される。層23に接続された導体62の第1の組66と、層24に接続された導体62の第2の組67との重畳を防止するために、第2の組67の1つの導体を除く全ての導体62が基板22の反対側に配置される。これらの導体62は、第8図に破線で示されている。外側の導体62Aは、第1組66のどの導体62にも交差せず、従って、基板22の他側に存在する必要はないが、もし所望ならば、このように配置することもできる。基板22の反対側で第2組67の共通の導体62に接続された個々の導体61は、基板22の厚みを貫通して延びて導体62と接続する(第7図に破線で示す)部分69を含んでいる。

オームメータ26は、層23、24の各々の

これにより得られた混合物を、約15000 gの遠心力により希釈水で洗浄し、水中の純粋な金の粒子の懸濁物を得た。

ゴート・アンチラビット IgG の抗体を、pH 9.6の炭酸塩緩衝液に添加し、1:5000 (w/v) の抗体水溶液を生成した。この水溶液1.0 ml を金の粒子に添加し、それにより得られた混合物を室温で一晩凝固させる。この混合物からの金の粒子をゴート・アンチラビット IgG と結合させ、約15000 gの遠心力により炭酸塩緩衝の塩水で洗浄し、余計な抗体を除去した。

第6図及び第7図を説明すれば、顕微鏡用のガラススライド40にチタニウム・オキシニトライド (TiO_xNy) の薄い層45を被覆した。高周波 (rf) マグネトロンスパッタ付着により色々な組成のチタニウム・オキシニトライドフィルムをガラススライド上に付着した。このチタニウム・オキシニトライド被膜を付着するのに用いた装置は、マテリアルズ・リサーチ・コーポレー

ジョン (Materials Research Corporation) のモデル 822 スパッタスフェアであった。このシステムの基本的な圧力は、 3×10^{-7} Torr であった。このシステムには、窒素及び酸素の混合物を後方充填した。 8×10^{-7} Torr の全圧力でスパッタリングを行なった。順方向電力は 1500 W であり、ターゲット電圧は 31.4 V であり、反射電力は 0 W であり、カソードとアノードの距離は 2.5 インチであり、スパッタリング時間は 30 分であった。

オキシニトライド物質は、酸素/窒素プラズマ中で反応性の付着を行なうことにより形成された。フィルムの組成を変えるために酸素と窒素の比率を変えた。フィルムの組成は、オージェの電子分光器で測定した。窒素と酸素の分子比が 0.30 ないし 0.40 の場合に、優れた抗原付着性を有するフィルムが形成された。TiOxNy フィルムにおける抗原付着の量は、プラスチックスライド上の場合と同等であり、同様の条件のもとでの被膜のないガラスに対する抗原付着性よりも

2 に塗布した。

次いで、金の凝集体の形成を顕微鏡で観察した。約 20 ミクロン長さの凝集体が観察され、隣接する凝集体のグループにも注目した。一般に、凝集体のサイズは、その長さが約 1 ミクロンから 20 ミクロンまで変化した。第 9 図は、巾が約 5 ミクロンの罫書き (線 42) をまたぐ大きな凝集体の形成を示している。巾が 20 ミクロン延びたスライド 40 上の線 42 については完全な橋絡が観察されなかった。然し乍ら、他の実験条件をそれに応じて調整した場合、例えば、大きな直径の金の粒子を使用した場合には、このような太い線巾も有用であるとされる。或る場合には、罫書きによって線 42 を形成する針の先端が不完全であるために多数の平行な線 42 が形成されるが、このようなことは避けねばならない。というのは、オームメータを層 51、52 に接続した時に抵抗値を実質的に変化させるには、全ての平行線を凝集体で橋絡することが必要になるからである。

第 10 図は、ラビット IGG 溶液で処理され

大きなものである。

次いで、金-パラジウム合金 (60:40) を各スライド 40 の上面に蒸着して、厚み 1000 Å の均一に分布した金-パラジウム層 41 を各スライド 40 上に形成した。次いで、各々の金-パラジウム層 41 の表面において点 46 と 47 との間に鋭い針を用いて罫書き (線) 42 が形成された。

次いで、先の丸い器具を使用し、領域 48、49 において層 41 をこすり落した。これにより、非導電性の線 42 によって分離された一對の 1000 Å 厚みの導電層 51、52 が残された。領域 51、52 における (線 42 を横切る) オームメータの読みは、2 百万オーム以上の読みであった。

水性のラビット IGG 溶液を線 42 の全長にわたって塗布し、18 時間 (一晚) 放置して抗原層 53 を形成した。次いで、IGG 溶液を取り除き、磷酸塩緩衝の塩溶液でスライド 40 を洗浄した。次いで、予め形成した金の標識のアンチラビット-IGG (金粒子直径 0.1-0.5 μm) を線 4

なかったこと以外はスライド 40 と同様に処理さ

れた制御スライドに対する結果を示している。この顕微鏡写真に示されたように、磷酸塩緩衝の塩溶液で洗浄した後にはこのスライドセグメント上に少数の小さな凝集体が残されるだけである。

種々のテストスライドに対し層 51、52 にわたってオームメータを接続した。1つのスライド 40 については、抵抗値の読みが 2 百万オーム以上から約 64000 オームまで減少した。線 42 が非常に広いか或いは針の先端の不完全さによって多数の線 42 が形成された殆どのスライド 40 に対し、抵抗値の変化は殆ど又は全くなかった。

以上の説明は、本発明の好ましい実施例に関するものであり、本発明は、ここに示した実施例に限定されるものでないことを理解されたい。本発明の範囲から逸脱せずに、上記実施例において種々の変更がなされ得ることを理解されたい。

4. 図面の簡単な説明

第 1 A 図、第 1 B 図、第 1 C 図、第 1 D 図及び第 1 E 図そして第 2 A 図、第 2 B 図、第 2 C 図、

第2D図及び第2E図は、本発明による免疫診断方法を説明する概略図、

第3図は、本発明の1つの実施例による反応検出器を示す回路図、

第4A図及び第4B図は、各々、第1A図ないし第1E図及び第2A図ないし第2E図の方法による凝集体の形成を示す概略図、

第5図は、本発明の一実施例による導電性粒子と非導電性基板との結合を示す概略図、

第6図は、本発明の一実施例による診断素子の概略図、

第7図は、第6図の診断素子の断面図、

第8図は、本発明による多診断素子の概略図、

第9図は、サンプルスライドを倍率5000で示す顕微鏡写真で、本発明の一例による凝集体の形成を示す図、そして

第10図は、凝集体のない制御スライドを倍率800で示す顕微鏡写真である、

更に、第1図ないし第8図は正しいスケールではないが、第9図及び第10図は正しいスケールである、

ルである、

11A・・・患者サンプル

11B・・・制御用サンプル

12A・・・特定の抗原

13A、13B・・・コロイド状の金の標本

14A、14B・・・金粒子

15A・・・抗体

16A、16B・・・混合物

18A・・・鉛体

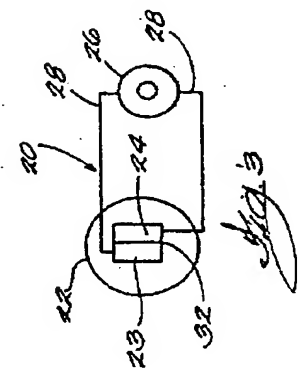
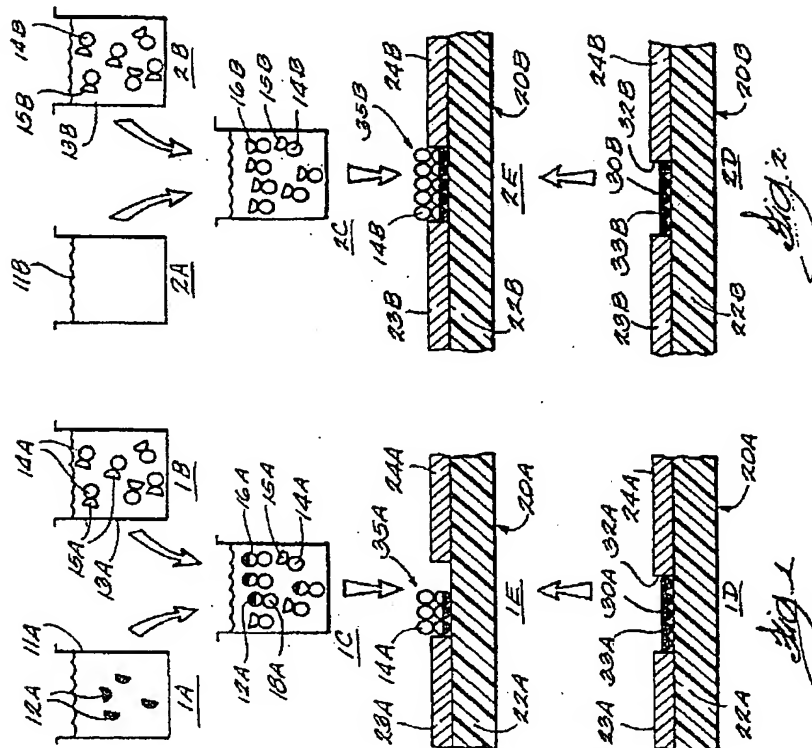
20・・・反応検出器

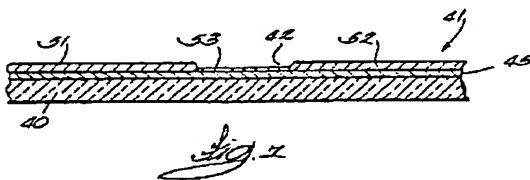
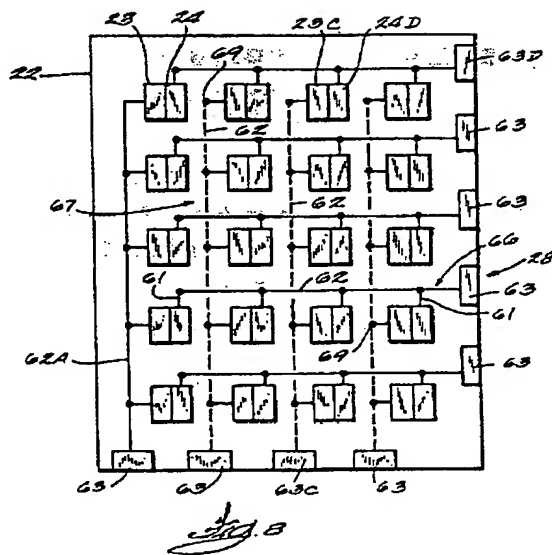
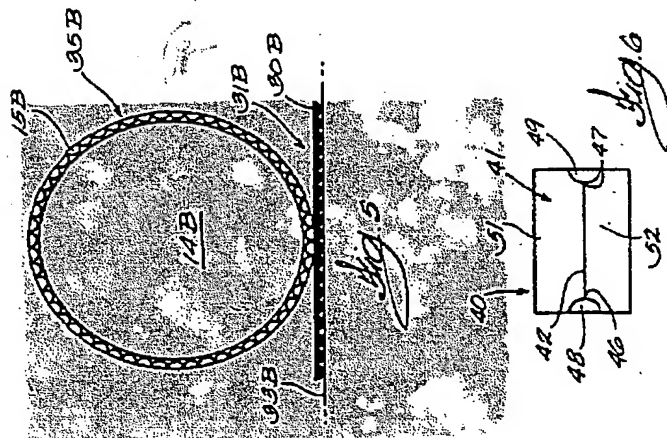
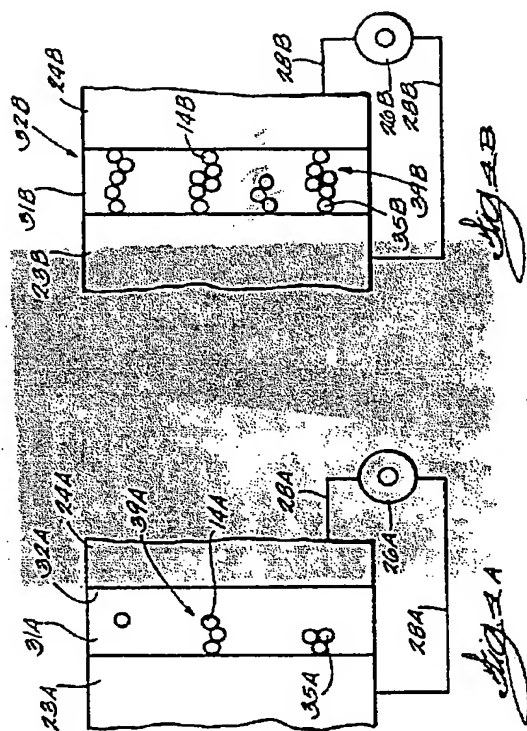
22・・・基板

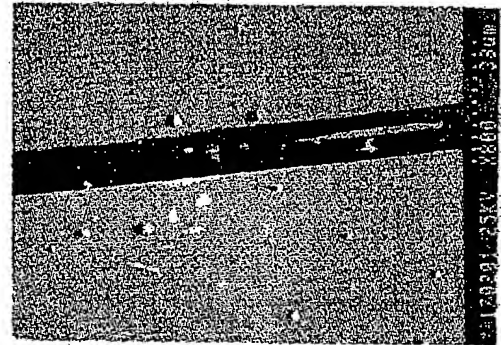
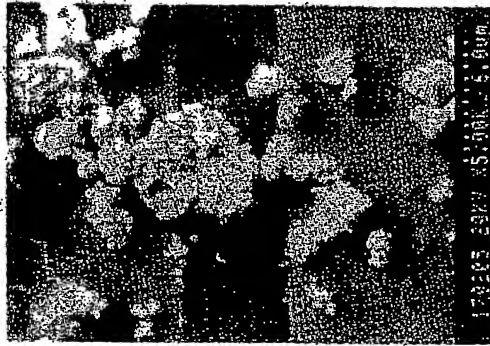
23、24・・・導電層

26・・・オームメータ

32・・・チャンネル







第 1 頁の続き

⑤Int.Cl.⁴

// G 01 N 27/02
27/30

識別記号

庁内整理番号

D-6843-2G
L-7363-2G

⑦発 明 者	ケニス エイ シーゲ スムンド	アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 53005 ブルックフ イールド プリムローズ レーン 17825
⑦発 明 者	ドナルド イー ヨー ド	アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 53220 グリーンフ イールド イングリッシュ メドース 6525

手続補正書(方式)

62.7.20

昭和 年 月 日

特許庁長官 小川 邦夫 殿



1. 事件の表示 昭和62年特許願第71319号

2. 発明の名称 結合反応を電子的に測定する方法

3. 補正をする者

事件との関係 出願人

氏名 スーザン ジェイ ムロックスキー

外2名

4. 代理人

住所 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号
電話(代) 211-8741

氏名 (5995) 弁理士 中 村

秘



5. 補正命令の日付 昭和62年6月30日

6. 補正の対象 明細書の図面の簡単な説明の欄

7. 補正の内容



明細書第35頁第14行から第36頁第1行の
「第9図は・・・・・・である。」を下記のとおり
訂正する。

「第9図は、サンプルスライドに形成された凝
集体の結晶構造を倍率5,000で示す顕微鏡写
真、そして

第10図は、制御スライドに形成された少数
の小さな凝集体の結晶構造を倍率800で示す
顕微鏡写真である。」

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.